

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/084665 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/409, 45/06, A61P 3/10, 9/10, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

(74) 代理人: 小野 信夫, 外(ONO, Nobuo et al.); 〒1010024 東京都千代田区神田和泉町 1-13-1 水戸部ビル 4 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002750

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 湯浅 真 (YUASA, Makoto) [JP/JP]; 〒3400021 埼玉県草加市手代町50番地134 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小柳津 研一 (OY-AIZU, Kenichi) [JP/JP]; 〒2730112 千葉県鎌ヶ谷市東中沢2-20-23-211 Chiba (JP). 山口 有朋 (YAMAGUCHI, Aritomo) [JP/JP]; 〒2270034 神奈川県横浜市青葉区桂台2-12-32 Kanagawa (JP). 羽生 幸弘 (HANYUU, Yukihiko) [JP/JP]; 〒9896175 宮城県古川市諏訪2丁目13-57 Miyagi (JP). 笠原 一訓 (KASAHARA, Kazunori) [JP/JP]; 〒3703511 群馬県群馬郡群馬町金古1381-10 Gunma (JP). 小室 雅廉 (KOMURO, Masayasu) [JP/JP]; 〒2200203 神奈川県津久井郡津久井町根小屋2111 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NIOSOME HAVING METAL PORPHYRIN COMPLEX EMBEDDED THEREIN, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND DRUG WITH THE USE THEREOF

(54) 発明の名称: 金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム、その製造法およびこれを利用する医薬

(57) Abstract: A niosome having a metal porphyrin complex embedded therein which contains a cationized metal porphyrin complex and a niosome-forming substance. This niosome having a metal porphyrin complex embedded therein has an SOD activity and can target super oxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and surely decrease it. Because of being in the form of a niosome, it can be delivered to, for example, a cancer cell *in vivo*. Therefore, it can decrease $O_2^{\cdot-}$ in a cancer cell and exert an excellent effect of treating cancer. Moreover, it shows a selective effect and, therefore, is usable as a novel anticancer agent with no side effect. In addition, it can be held in the blood, which makes it favorable as an antioxidant. Owing to this characteristic, it can protect the living body from *in vivo* disorders caused by active oxygen.

(57) 要約: カチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質を含有する金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームである。本発明の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームは、SOD 活性を有し、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) をターゲットとし、これを確実に低減させることができるものである。そして、ニオソームとしたことにより、生体内の、例えば癌細胞中へと到達することが可能となった。従って、癌細胞中の $O_2^{\cdot-}$ を低下させて癌の治癒に優れた効果を奏することができ、しかもその効果は選択的であるので、副作用のない新たな抗癌剤として利用可能なものである。また、血液中滞留も可能であるという抗酸化剤として優れた効果を有するので、活性酸素のもたらす生体内障害から生体を守ることができるものである。

WO 2005/084665 A1

明 細 書

金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム、その製造法およびこれを利用する医薬

技 術 分 野

本発明は、金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームに関し、更に詳細には、生体内において抗癌剤あるいは抗酸化剤として作用する金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームおよびその製造法に関する。

背 景 技 術

一般に、生体内で生成される数々の活性酸素種は炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、癌、糖尿病等多くの病態に関与しているといわれているが、通常生体では、これらの活性酸素種に対し、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、カタラーゼ等のラジカル消去酵素を備えてバランスを保っている。

しかしながら、生体内の癌細胞においては $O_2^{\cdot -}$ が多量に存在していることが知られており、これらの酵素活性の低下していることが伺える。

一方、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、糖尿病等の疾病でも、その原因は、SOD、カタラーゼ等のラジカル消去酵素のバランスが崩れ、 $O_2^{\cdot -}$ などの活性種が増加したことによるものとされている。

ところで、金属ポルフィリン錯体は高いSOD活性を示すことが報告されているので、このものを生体内に投与することにより、 $O_2^{\cdot -}$ を初めとする活性酸素種を有効に消去させ、活性酸素のもたらす生体内障害から生体を守ることが予想される。

しかし、金属ポルフィリン錯体を単独で生体内に投与することは、安全性や効果の点から問題も多く、現在まで医薬として利用するに至っていないのが実情である。

本発明はこれらの点に鑑みてなされたものであり、金属ポルフィリン錯体を安全に生体内に投与することができ、しかも金属ポルフィリン錯体の有するSOD活性を発揮させることのできる手段を提供することをその課題とするものである。

また、現在臨床的に用いられておりながら、副作用が大きな問題となっているシスプラチンやマイトマイシンC等の抗癌剤に代わる、癌細胞にのみ選択的に効果を示す抗癌剤や、活性酸素種が関連するといわれる、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、糖尿病等の癌以外の疾患を治療する抗酸化剤の提供もその課題とする。

発 明 の 開 示

本発明者らは、癌細胞内に存在している $O_2^{\cdot -}$ をターゲットとし、金属ポルフィリン錯体のSOD活性作用を利用してこの濃度を低下させる手段について、種々検討した結果、金属ポルフィリン錯体をニオソームに包埋せしめることにより、優れたSOD活性を有したまま安全に体内に投与可能であり、しかも血液中滞留も可能であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、カチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質を含有する金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームである。

また本発明はカチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質を混合し、次いでこの混合物を媒質中で超音波処理することを特徴とする金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームの製造法である。

更に本発明は、カチオン化金属ポルフィリン錯体とアニオン系界面活性剤を反応させてイオンコンプレックスを形成させ、次いで、このイオンコンプレックスとニオソーム形成物質を混合し、更にこの混合物を媒質中で超音波処理することを特徴とする金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームの製造法である。

また更に本発明は、上記金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム有効成分として含有する医薬である。

図面の簡単な説明

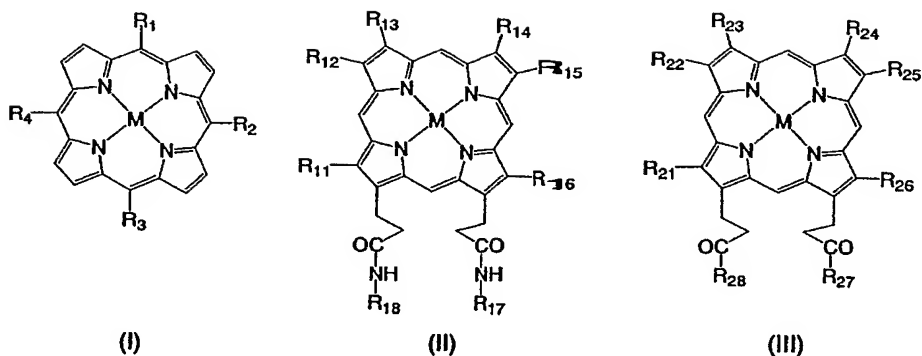
図1は、金属ポルフィリン錯体としてFeT2MPyP系を、ニオソーム形成物質としてプルロニックF-88を使用した場合の抗癌特性試験結果を示す図面である。図中、▲はイオンコンプレックス2 (FeT2MPyP/4SAS) を、■(点線)はプルロニックF-88を、■(実線)はCDDPを、◆はMMCを、●は本発明品9をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書中において、「金属ポルフィリン包埋ニオソーム」とは、金属ポルフィリン錯体が、ニオソーム形成物質、例えばノニオン系界面活性剤やこれとコレステロール類等の混合物が形成するニオソーム中に組み込まれ、その一部がニオソーム膜外に出ているか、あるいは全くニオソーム膜内に包含されているものを意味する。

本発明の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームは、カチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質を含有するものである。

本発明の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム（以下、単に「Por包埋ニオソーム」ということがある）の構成成分であるカチオン化ポルフィリン錯体は、置換基としてカチオン性窒素原子を有する基を有するポルフィリン錯体であり、例えば、式(I)、(II)または(III)



(式中、 R_1 ないし R_4 の少なくとも一つは、 N -低級アルキルピリジル基、低級アルキルアンモニオフェニル基、 N -低級アルキルイミダゾリル基から選ばれる基を、 R_{11} ないし R_{16} および R_{21} ないし R_{26} は、低級アルキル基または低級アルコキシ基を、 R_{17} および R_{18} 、 N -低級アルキルピリジル基、低級アルキルアンモニオフェニル基、 N -低級アルキルイミダゾリル基から選ばれる基を、 R_{27} ないし R_{28} は N -アルキルアンモニオ基を示す)

より具体的には、上記式(I)において、基 R_1 がメチルピリジル基である、5,10,15,20-テトラキス(2-メチルピリジル)ポルフィリン(T2MPyP)、5,10,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィリン(T4MPyP)、5,10,15,20-テトラキス(3-メチルピリジル)ポルフィリン(T3MPyP)等や、上記式(II)において、基 R_2 がメチルピリジルアミドエチル基である、[1,3,5,8-テトラメチル-2,4-ジビニル-6,7-ジ(4-メチルピリジルアミドエチル)]ポルフィリン(PPIX-DMPyAm)等を例示することができる。

これらのカチオン化ポルフィリン錯体に配位する金属としては、鉄(Fe)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、銅(Cu)、モリブデン(Mo)、クロム(Cr)、イリジウム(Ir)等が好ましい。

上記のうち、金属が配位した式(I)で表されるカチオン化ポルフィリン錯体の合成は、K. Kalyanasundaram, Inorg. Chem., 23, 2453(1984)、A. D. Adler et al., J. Inorg. Nucl. Chem., 32, 2443(1970)、T. Yonetani et al., J. Biol. Chem.,

245, 2988(1970)、P. Hambright, Inorg. Chem., 15, 2314(1976)等に記載の方法に準じて行うことができる。

また、金属が配位した式(II)で表されるカチオン化ポルフィリン錯体の合成は、E. Tsuchida, H. Nishide, H. Yokoyama, R. Young, and C. K. Chang, Chem. Lett., 1984, 991 等に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明のP o r包埋ニオソームの製造は、上記カチオン化ポルフィリン錯体のみを使用することによっても行われるが、カチオン化金属ポルフィリン錯体をアニオン系界面活性剤と反応させて得られるイオンコンプレックス（以下、単に「イオンコンプレックス」という）を利用して製造することが好ましい。

このイオンコンプレックスの製造に用いることのできるアニオン系界面活性剤としては、脂肪酸のアルカリ金属塩や、アルキル硫酸のアルカリ金属塩が好ましく、その例としては、ラウリン酸（L A S）、ミリスチン酸（M A S）、パルミチン酸（P A S）、ステアリン酸（S A S）、オレイン酸（O A S）等の脂肪酸のアルカリ金属塩や、ドデシル硫酸（S D S）、テトラデシル硫酸（S T S）、ヘキサデシル硫酸（S H S）、オクタデシル硫酸（S O S）等のアルキル硫酸のアルカリ金属塩挙げることができる。なお、脂肪酸のアルカリ金属塩や、アルキル硫酸のアルカリ金属塩としては、ナトリウム、カリウム等が好ましい。

上記イオンコンプレックスを形成するには、適当な溶媒中でカチオン化金属ポルフィリン錯体とアニオン系界面活性剤を混合すれば良く、カチオン化金属ポルフィリン錯体とアニオン系界面活性剤との配合比は、それらのモル比で、1 : 1 ないし 1 : 2 0 程度とすれば良い。

一方、上記カチオン化金属ポルフィリン錯体もしくはこれとアニオン性界面活性剤よりなるイオンコンプレックスは、ニオソーム形成物質物質と混合し、ニオソームを形成させるための常法によりP o r包埋ニオソームとすることができる。

このニオソーム形成物質としては、ニオソームを形成することが報告されている種々の化合物を利用することができるが、ノニオン系界面活性剤や、これとコ

レステロール類もしくはトリアシルグリセロールの混合物を利用することが好ましい。

このうちノニオン系界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー等の1種または2種以上を使用することができる。これらノニオン性界面活性剤の具体例としては、Tween-61（以下、「TW61」と略すことがある）、Tween-80、Span 80（共に日本油脂社製）、プルロニックF-88（以下、「F88」と略すことがある）（旭電化社製）等を挙げることができる。

また、コレステロール類としては、コレステロール、 α -コレスタノール、 β -コレスタノール、コレスタン、デスモステロール（5,24-コレスタジエン-3 β -オール）、コール酸ナトリウムまたはコレカルシフェロール等を挙げることができる。

上記のカチオン化金属ポルフィリン錯体またはイオンコンプレックスとニオソーム形成物質からPor包埋ニオソーム形成するには、まず、これら成分を適当な溶媒中に取り、これを十分混合させることが必要である。

ニオソーム形成に当たって、式(II)または(III)で表されるカチオン化金属ポルフィリン錯体は、そのままでもニオソーム中に包埋させることができるが、式(I)の、カチオン化金属ポルフィリン錯体はイオンコンプレックスの状態でニオソームを形成することが好ましい。

ニオソームを形成させるに当たってのカチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質の使用量は、カチオン化金属ポルフィリン錯体またはイオンコンプレックス1モルに対し、ニオソーム形成物質を10から500モル、特に、50から300モルとすることが好ましい。

ニオソームの形成は、既に公知の方法により行うことができ、例えば、上記両成分を揮発性溶媒中に溶解、混合した後、揮発性溶媒のみを揮散、除去し、次の

でこれに適当な水性溶媒、例えば、精製水、生理食塩水等を加え、激しく攪拌したり、超音波処理することによりP o r包埋ニオソームとすることができる。

なお、必要により、水性溶媒に代えて医薬的に有効な成分を溶解した溶液や、ある種の培地等を使用することができ、これらを内包したP o r包埋ニオソームを得ることもできる。

かくして得られたP o r包埋ニオソームは、後記のようにその構造解析を蛍光スペクトルや動的光散乱測定等を用いて行った結果、カチオン化金属ポルフィリン錯体部分はニオソームの表面または脂質等の親水部に存在し、界面活性剤のアルキル側鎖は脂質の疎水性部に埋め込まれていることが示された。

また、ニオソームの粒径は100nm以下であり、特に30nm以下の径の小胞体とすることができ、体内に取り込まれた際、細胞に到達可能な大きさであることがわかった。

更に、後記するように、P o r包埋ニオソームの抗癌特性試験を行った結果、当該ニオソームの原料である単純なカチオン化金属ポルフィリン錯体を投与した場合に比べ、P o r包埋ニオソームを使用した場合の効果が優れており、この効果は、現在抗癌剤として使用されているシスプラチンやマイトマイシンCより高いことが示された。

更にまた、P o r包埋ニオソームのSOD活性を評価したところ、このものは当該ニオソームの原料である単純なカチオン化金属ポルフィリン錯体と同等のSOD活性を示すことがわかり、血中滞留型のSOD化合物になり得ることがわかった。

以上のように、本発明のP o r包埋ニオソームは、優れた抗癌作用を有するものであり、癌治療の分野において抗癌剤として使用可能なものである。

従って、癌患者にこのP o r包埋ニオソームを直接投与、静脈内投与、皮下投与等により投与することによって当該患者の癌を治療することができる。

同様、本発明のP o r包埋ニオソームは、優れた抗酸化作用を有し、活性酸素

のもたらす生体内障害、例えば、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、糖尿病から生体を守ることができる。

従って、このものを炎症疾患、神経疾患、動脈硬化または糖尿患者に、直接投与、静脈内投与、皮下投与等により投与することによって当該患者の癌を治療することができる。

実施例

以下に、実施例および試験例を示し、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら制約されるものではない。

実施例 1

鉄 [5,10,15,20-テトラキス (2-メチルピリジル) ポルフィリン] (FeT2MPyP) の合成:

(1) プロピオン酸 500 ml を 110°C まで攪拌・加熱後、2-ピリジルカルボキシアルデヒド 15 ml (0.158 mol) を加えた。その後、ピロール 12 ml (0.173 mol) を注射器で少しずつ滴下し、110°C で 1 時間還流を行って環化縮合した。反応後、室温まで放冷し、溶媒を留去した。中和、洗浄およびカラムクロマトグラフィー (アルミナ basic type I、クロロホルム) を行い、生成物である 5,10,15,20-テトラキス (2-ピリジル) ポルフィリンを得た (収量 1.1 g、収率 4.4%)。

$^1\text{H-NMR}$ δH (CDCl_3 , ppm) :

−2.82 (ピロールNHのH、2H)、7.72~9.14 (ピリジンのH、16H)、8.87 (ピロールのH、8H)

UV-vis λ_{max} (クロロホルム, nm)

418、513、544、586、645

FAB-Mass (m/z)

619、620

(2) 次に、アルゴン (Ar) 雰囲気下でジメチルホルムアミド 150 ml に上記 (1) で得た 5,10,15,20-テトラキス (2-ピリジル) ポルフィリン 0.2 g ($3.2 \times 10^{-4} \text{ mol}$) を加えて溶解させ、さらに、鉄 0.2 g と 48% 臭化水素酸 5 ml より得た臭化鉄 (FeBr_2) を加えて 4 時間還流した。反応後、室温まで放冷し、溶媒を留去した。

水/クロロホルムによる分液操作およびカラムカラムクロマトグラフィー (アルミナ basic type I、メタノール) を行い、前駆体の鉄 [5,10,15,20-テトラキス (2-ピリジル) ポルフィリン] を得た (収量 0.21 g、収率 94%)。

UV-vis λ_{max} (メタノール、nm)

408、512、566

FAB-Mass (m/z)

672

(3) ジメチルホルムアミド 30 ml 中に、上記 (2) で得た鉄 [5,10,15,20-テトラキス (2-ピリジル) ポルフィリン] 0.1 g と p-トルエンスルホン酸メチル 6 ml とを加え、130°C で 5 時間還流した。還流後、室温まで放冷し、溶媒を留去した。抽出、カラムクロマトグラフィー (アルミナ basic type I、メタノール) を行い、目的物質である FeT2MPyP を得た (収率 91%)。

UV-vis λ_{max} (水、nm)

408、584

元素分析 (%)

Found. C 75.11、H 3.97、N 17.66、C/N 4.25

Calcd. C 77.58, H 4.24, N 18.12, C/N 4.28

(4) 工程(1)において、2-ピリジルカルボキシアリドを4-ピリジルカルボキシアリドに変える以外は上記(1)工程ないし(3)工程と同様にして鉄[5,10,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィリン](FeMT4MPyP)を得た。他の金属[5,10,15,20-テトラキス(2-メチルピリジル)ポルフィリン](MT2MPyP)および他の金属[5,10,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィリン](MT4MPyP)も上記に準じて合成できる。

実施例 2

マンガン[5,10,15,20-テトラキス(2-メチルピリジル)ポルフィリン](MnT2MPyP)の合成:

(1) プロピオン酸 500ml を 110℃まで加熱し、2-ピリジルカルボキシアリド 15ml、その後にピロール 12ml を少しずつ加え、全て加えた後1時間還流した。反応後、放冷、エバポレーション、中和および洗浄を行った。その後、カラムクロマトグラフィー(塩基性アルミナ、クロロホルム)等で精製し、紫色結晶として、5,10,15,20-テトラキス(2-ピリジル)ポルフィリンを得た(収量1.68g、収率7.08%)、

$^1\text{H-NMR}$ δH (CDCl₃, ppm)

-2.8 (ピロールNHのH, 2H)、7.7 (ピリジンのH (4位)、4H)、8.1 (ピリジンのH (5位)、4H)、8.2 (ピリジンのH (6位)、4H)、9.2 (ピリジンのH (4位)、4H)、8.8 (ピロールのH, 8H)

UV-vis λ_{max} (クロロホルム, nm)

418、513、544、586、645

F A B - M a s s (m/z)

619、620

(2) 次に、上記(1)で得た5,10,15,20-テトラキス(2-ピリジル)ポルフィリン 500mgを含むジメチルホルムアミド(DMF)溶液 200mlを、アルゴン(Ar)置換した後、酢酸マンガン・四水和物 1.98gを加えて、Ar下で3時間還流した。反応後、放冷、エバポレーション、水/クロロホルムによる分液操作、減圧乾燥を行い、マンガン[5,10,15,20-テトラキス(2-ピリジル)ポルフィリン]を得た(収量409mg、収率75.2%)。

U V - v i s λmax (クロロホルム、nm)

461、555

F A B - M a s s (m/z)

672

(3) 次に、上記のマンガン[5,10,15,20-テトラキス(4-ピリジル)ポルフィリン] 200mgとp-トルエンスルホン酸メチル 12mlとを反応させた(130℃、8時間)。反応後、放冷、水/クロロホルムによる分液操作を行い、更に、カラムクロマトグラフィー[(1)酸性アルミナおよび(2)塩基性アルミナ、メタノール]を行って、目的物質であるMnT2MPyPを得た(収量153mg)。

U V - v i s λmax (水、nm)

456、555

(4) 工程(1)において、2-ピリジルカルボキシアリドを4-ピリジルカルボキシアリドに変える以外は上記(1)工程ないし(3)工程と同様にしてマンガン[5,10,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィ

リン] (MnT4MPyP) を得た。他の金属 [5,10,15,20-テトラキス (2-メチルピリジル) ポルフィリン] (MT2MPyP) および他の金属 [5,10,15,20-テトラキス (4-メチルピリジル) ポルフィリン] (MT4MPyP) も上記と同様にして合成できる。

実施例 3

P o r 包埋ニオソームの合成 (1) :

(1) カチオン化金属ポルフィリン錯体であり、実施例1で得られた FeT2MPyP 1.4 mg ($1 \mu\text{mol}$) と、界面活性剤である SAS 0.3 mg ($1 \mu\text{mol}$) を試験管に取り、これに溶媒としてメタノール 10 ml を加えて混合し、イオンコンプレックス1 ($\text{FeT2MPyP}/1\text{SAS}$) を調製した。

また、上記の SAS $1 \mu\text{mol}$ に代え、SAS 1.2 mg ($4 \mu\text{mol}$) および OAS 1.2 mg ($4 \mu\text{mol}$) を用い、それぞれイオンコンプレックス2 ($\text{FeT2MPyP}/4\text{SAS}$) およびイオンコンプレックス3 ($\text{FeT2MPyP}/4\text{OAS}$) を得た。

同様、カチオン化金属ポルフィリン錯体として、 MnT2MPyP 、 MnT4MPyP 、 $\text{FeT2MPyP} + \text{MnT2MPyP}$ ($0.5 \mu\text{mol} : 0.5 \mu\text{mol}$) および $\text{FeT4MPyP} + \text{MnT4MPyP}$ ($0.5 \mu\text{mol} : 0.5 \mu\text{mol}$) を用い、界面活性剤として、SAS、OASを用い、表1に示すイオンコンプレックス4～9を調製した。

表 1

| イオンコンプレックス | カチオン化金属ポルフィリン | 界面活性剤 | カチオン化金属ポルフィリン/界面活性剤 |
|------------|--|-------------------|---------------------|
| 1 | FeT2MPyP [1 μ mol] | SAS [1 μ mol] | 1/1 |
| 2 | FeT2MPyP [1 μ mol] | SAS [4 μ mol] | 1/4 |
| 3 | FeT2MPyP [1 μ mol] | OAS [4 μ mol] | 1/4 |
| 4 | MnT4MPyP [1 μ mol] | SAS [1 μ mol] | 1/1 |
| 5 | MnT4MPyP [1 μ mol] | SAS [4 μ mol] | 1/4 |
| 6 | MnT2MPyP [1 μ mol] | SAS [1 μ mol] | 1/1 |
| 7 | MnT2MPyP [1 μ mol] | SAS [4 μ mol] | 1/4 |
| 8 | FeT2MPyP+MnT2MPyP (1:1) [1 μ mol] | SAS [4 μ mol] | 1/4 |
| 9 | FeT4MPyP+MnT4MPyP (1:1) [1 μ mol] | SAS [4 μ mol] | 1/4 |

(2) 次に、試験管に上記のイオンコンプレックス1 (1 μ mol) と、ニオソーム形成物質である Tween-61 0.131 g (100 μ mol) およびコ

レステロール 0.0386 g ($100 \mu\text{mol}$) を取り、溶媒として少量のクロロホルムを用いて混合した。溶媒を留去して薄膜を形成させた後、そこに生理食塩水 10 ml 加え、超音波処理 (Ar 下、氷浴中、30 W、3 min、プローブ型超音波照射装置) を行った。超音波処理後、静置 (60°C 、30 min) および濾過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}\phi$) し、Por 包埋ニオソーム (FeT2MPyP / 1 SAS 包埋 TW61-Chol ニオソーム; 本発明品 1) を得た。

(3) イオンコンプレックス 2 ($1 \mu\text{mol}$) を用い、上記 (2) と同様にして、Por 包埋ニオソーム (FeT2MPyP / 4 SAS 包埋 TW61-Chol ニオソーム (本発明品 2) を得た。また、イオンコンプレックス 1、2、4~6 を用い、上記と同様にすれば、表 2 に示す Por 包埋ニオソーム (本発明品 3 から 8) が得られる。

表 2

| ポルフィリン錯体包埋リポソーム | イオンコンプレックス | ニオソーム形成物質 |
|---|------------|------------------------------|
| FeT2MPyP/1SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品1) | 1 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| FeT2MPyP/4SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品2) | 2 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| FeT4MPyP/1SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品3) | 1 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| FeT4MPyP/4SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品4) | 2 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| MnT2MPyP/1SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品5) | 6 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| MnT2MPyP/4SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品6) | 7 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| MnT4MPyP/1SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品7) | 4 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |
| MnT4MPyP/4SAS包埋TW61 -cholニオソーム (本発明品8) | 5 | Tween-61およびコレステ ロール (1:1) |

実施例 4

Por包埋ニオソームの合成 (2) :

試験管に、表1のイオンコンプレックス2 ($0.5 \mu\text{mol}$) とニオソーム形成物質であるプルロニック (Pluronic) F-88 0.54 g ($50 \mu\text{mol}$) およびコレステロール 0.0154 g ($40 \mu\text{mol}$) を秤り取り、これに溶媒として少量のクロロホルム (約 3 ml) を加え混合した。溶媒を留去して薄膜を形成させた後、生理食塩水 10 ml を加え、超音波処理 (氷浴中、 30 W 、 30 min 、プローブ型超音波照射装置) を行った。超音波処理後、静置 (50°C 、 30 min) および濾過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}\phi$) し、P o r 包埋ニオソーム (F e T 2 M P y P / 4 S A S 包埋 F 8 8 - C h o l ニオソーム ; 本発明品 9) を得た。

実施例 5

P o r 包埋ニオソームの動的光散乱測定 (その1) :

P o r 包埋ニオソームの粒径および粒径分布を測定するため動的光散乱測定 (Nicomp 370, Particle Sizing System) を行った。実施例3に従い合成した F e T 2 M P y P / 1 S A S 包埋 T W 6 1 - c h o l ニオソーム (本発明品1) および F e T 2 M P y P / 4 S A S 包埋 T W 6 1 - c h o l ニオソーム (本発明品2) の動的光散乱測定結果を表3に示す。

表 3

| ポルフィリン錯体包埋ニオソーム | | 第一の分布ピーク | 第二の分布ピーク |
|--------------------------------------|-----|-----------|----------|
| FeT2MPyP/1SAS包埋TW61-choIニオソーム(本発明品1) | 数分布 | 28.4 [90] | 145 [10] |
| FeT2MPyP+4SAS包埋TW61-choIニオソーム(本発明品2) | 数分布 | 28.5 [90] | 146 [10] |

(注) カギカッコ外の数字は粒径 (nm) を示し、カギカッコ内の数字は分布割合 (%) を示す。

この結果より、数分布では平均粒径 28.5 nm のものが 90%、146 nm のものが 10% 存在していた。この結果は TEM 観察の結果と対応した。表 4 より、どの Por 包埋ニオソームの平均粒径も 100 nm 以下であり、体内に投与

した場合毛細血管内皮を越えて目的の細胞に到達可能であることが明らかとなった。

S

実施例 6

P o r 包埋ニオソームの動的光散乱測定（その 2）：

実施例 6 と同様にして、M n T 2 M P y P / 1 S A S 包埋 T W 6 1 - c h o l ニオソーム（本発明品 5）の動的光散乱測定を行った結果、このものの平均粒径は 28.5 nm（分布割合は 90% で、残りは平均粒径 146 nm のものが 10% 程度）、M n T 2 M P y P / 4 S A S 包埋 T W 6 1 - c h o l ニオソーム（本発明品 6）の平均粒径は 28.5 nm（分布割合は 90% で、残りは平均粒径 146 nm のものが 10% 程度）となり、平均粒径 100 nm 以下であって生体内投与しても問題の無い大きさであった。

実施例 7

P o r 包埋ニオソームの蛍光スペクトル測定：

（1）P o r 包埋ニオソームにおいて、包埋したポルフィリン錯体がニオソーム内のどの位置に存在しているかを評価するため、P o r 包埋ニオソームの蛍光スペクトル測定（島津製作所、R F - 5 3 0 0 P C）を行った。

この測定においては、金属ポルフィリン錯体は一般に蛍光消光するため、金属ポルフィリン錯体に代え、金属挿入を行っていないカチオン化金属フリーポルフィリン錯体（以下、「金属フリー錯体」という）を実施例 1、2 等に準じて合成し、これを蛍光プローブとして用いた。また、金属フリー錯体包埋ニオソームの合成は実施例 3 に準じて行った。（以下、金属フリー錯体の略号としては、M の代わりにカチオン化金属ポルフィリン錯体の略号中の M を、H₂ に代えて示す。例えば、金属 [5,10,15,20-テトラキス（2-メチルピリジル）ポルフィリン]（M T 2 M P y P）の金属フリー錯体は H₂ T 2 M P y P と、金属 [5,1

0,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィリン] (MT4MPyP) の金属フリー体では $H_2T4MPyP$ と示す。)

上記のようにして、調製したカチオン化金属フリー錯体包埋ニオソーム、例えば、 $H_2T2MPyP/4SAS$ 包埋TW61-cho1ニオソームおよび $H_2T2MPyP/4SAS$ 含有各種溶液における $H_2T2MPyP$ の蛍光スペクトル測定(測定波長範囲500~800nm)を行ったところ、 $H_2T2MPyP/4SAS$ 包埋TW61-cho1ニオソーム水溶液では645nmにピークを有する蛍光スペクトルが得られた。

この蛍光ピーク波長は水およびメタノール中での $H_2T2MPyP$ の蛍光波長の間であった(蛍光ピーク波長(短波長側)水<包埋ニオソーム溶液<メタノール(長波長側))。

また各溶媒のピークは、メタノール(642nm)、エタノール(643nm)、2-プロパノール(645nm)、n-ブタノール(645nm)、エチレングリコール(642nm)等の各種溶媒中での $H_2T2MPyP$ の蛍光スペクトルは上記と同様のスペクトル波形であった。しかし、水での $H_2T2MPyP$ の蛍光スペクトルはピークがブロードとなり、強度も大きく低下し、さらには短波長にシフト(630nm)した。これより、ニオソームに包埋された $H_2T2MPyP$ は上記のアルコール類と類似の極性環境、すなわち、水環境よりもやや非極性な(やや疎水的な)環境である二分子膜の親水部付近に存在すると考えられる。また、 $H_2T2MPyP/1SAS$ 包埋TW61-cho1ニオソームの結果も同様であった。

(2) 次に、ニオソームの二分子膜親水部付近に存在して二分子膜の極性、流動性等の指標となる蛍光プローブである8-アニリノー1-ナフタレンスルホン酸(ANS)を用いた蛍光スペクトル測定を行った。まず、メタノール、メタノール/クロロホルムおよびANS包埋TW61ニオソーム(ポルフィリン錯体は包

埋されていない) 溶液中でのANSの蛍光スペクトルは、どれも485nm(励起波長385nm)にピークを示す類似のスペクトルとなった。次に、ポルフィリン錯体とANSと一緒に包埋したTW61ニオソーム溶液中でのANSの蛍光スペクトルを測定したところ、485nmではなく450および500nmの2つのピークを示し、これら2つのピーク蛍光強度も485nmでのそれに比べて減少した。この付近にポルフィリン錯体のSoret帯の吸収ピークが存在することより、ANSとポルフィリン錯体の相互作用が生じたと考えられ、ポルフィリン錯体はANS近傍に存在すると考えられる。これらのことよりニオソームに包埋されたH₂T2MPyPは上記のアルコール類と類似の極性環境に存在し、二分子膜の親水部付近に存在すると考えられる。

また、二分子膜内部(疎水部)に存在する蛍光プローブである1,6-ジフェニルー1,3,5-ヘキサトリエン(DPH)とポルフィリン錯体と一緒に包埋させたニオソームではポルフィリン錯体のSoret帯、及びDPHのピークである410nm、434nmおよび457nmにおいてピークの減少は見られず、これよりDPHとポルフィリン錯体との相互作用はなく、ポルフィリン錯体はDPH近傍には存在しないことが分かった。これらのことよりニオソームに包埋されたH₂T2MPyPは上記のアルコール類と類似の極性環境に存在し、二分子膜の親水部付近に存在すると考えられる。

実施例 8

P o r 包埋ニオソームの蛍光偏光解消測定:

蛍光プローブとして二分子膜の親水部近傍に存在する1,6-ジフェニルー1,3,5-ヘキサトリエン(DPH、1 μM)を用いた金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームにおける蛍光偏光解消測定を行った(島津製作所、RF-5300PCおよびRF-540/5000用偏光測定付属装置、測定温度範囲5-60℃、励起波長361nm、蛍光波長428nm)。例えば、DPHを含有した

TW61-cholesterolニオソーム（ブランク）の蛍光偏光解消測定（温度-偏光度の関係（逆シグモイダル曲線））では、TW61-cholesterolニオソーム二分子膜の相転移温度（ $T_c = 36^\circ\text{C}$ ）付近で蛍光偏光度の減少がみられた。DPHを含有したFeT2MPyP/1SAS包埋TW61-cholesterolニオソームの蛍光偏光解消測定（温度-偏光度の関係）では、上記のブランクと同様に $T_c (= 37^\circ\text{C})$ 付近で蛍光偏光度の減少が見られたが、偏光度はゲル状態で大きい値を示していた。これは、FeT2MPyP/1SASとTween-61およびコレステロールとの相互作用に基づくものであり、FeT2MPyP/1SASがTween-61とコレステロールが形成するニオソーム二分子膜中に存在することを裏付けている。

また、DPHを含有したMnT2MPyP/1SAS包埋ニオソームの蛍光偏光解消測定（温度-偏光度の関係）は、上記のブランクに比べやや高温側に移行し、縦軸の偏光度もゲル領域で増加した。これらのことも、MnT2MPyP/1SASとTween-61およびコレステロールの相互作用に基づき、MnT2MPyP/1SASがTween-61およびコレステロールのニオソーム二分子膜中に存在することを裏付けている。

実施例 9

Por包埋ニオソームの抗癌特性試験：

本発明のPor包埋ニオソームの抗癌特性を、アラマー・ブルー（Alamar Blue）法を用いた殺細胞試験（細胞死試験）により調べた。

本試験の試験試料としては、各種のPor包埋ニオソーム（金属ポルフィリン錯体濃度0、12.5、25、50、100 μM ）を用い、参照試料としては、上記Por包埋ニオソームの成分である金属ポルフィリン錯体（濃度0、12.5、25、50、100 μM ）およびニオソーム（濃度、2500、5000、10000、20000 μM ）を用いた。（どちらもPor包埋ニオソームの濃

度に対応させた。)

また、比較試料としては、現在用いられている抗癌剤であるシスプラチン (CDDP、濃度0、10、20、40、80 μ M) およびマイトマイシンC (MMC、濃度0、7.5、15、30、60 μ M) 等を用い、細胞としてマウス肺ガン細胞 [Lewis Lung Carcinoma (LLC)、理研ジーンバンク] を用いた。

具体的な試験方法は次の通りである。すなわち、10% FBSを加えたDME M培地で細胞を培養し、細胞数計測および細胞濃度調製を行ない、細胞懸濁液 (100 μ l/well、細胞数 1×10^4 cell/well) を得た。この細胞懸濁液を、96ウェルプレートの各ウェルに加え、二酸化炭素 (CO₂) インキュベーター (CO₂ 5%) 内で24時間培養した。ウェルプレート内の培地を除去後、予め調製しておいた各濃度の試料溶液 (100 μ l/well、薬剤濃度0~100 μ M) を添加し、さらにCO₂インキュベーター内で24時間インキュベートした。濾過滅菌したアラマー・ブルー溶液 (10 μ l/well) を添加し、さらに5時間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定 (測定波長570 nmおよび参照波長600 nm) を行った。

Por包埋ニオソームとしてFeT2MPyPを包埋したプルロニックF-88ニオソーム (本発明品9) を使用した場合の結果を図1に示す。この結果から、試料の添加濃度の増大と共にLLCの細胞生存率の低下が見られ、効果的な抗癌特性を示した。特に、FeT2MPyP濃度25 μ M以上におけるイオンコンプレックスFeT2MPyP/4SASのLLC細胞生存率は、CDDPおよびMMCのそれらに比べやや低かった。更に、FeT2MPyP/4SAS包埋F88-Cholニオソームは、添加濃度の増大と共にLLC細胞生存率の低下が見られ、添加濃度50 μ Mで細胞生存率10%以下となり、現在使用されているCDDPおよびMMCより優れた抗癌特性を示した。

また、P o r包埋ニオソームであるF e T 2 M P y P / 1 S A S包埋T W 6 1 - c h o lニオソーム（本発明品1）およびF e T 2 M P y P / 4 S A S包埋T W 6 1 - c h o lニオソーム（本発明品2）も、現在使用されているC D D PおよびM M Cより優れた抗癌特性を示した。（例えば、添加濃度50 μ Mにおいて抗癌特性は現在使用されている抗癌剤<イオンコンプレックス>カチオン化金属ポルフィリン錯体<金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームの順に増大した）。これより、金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームは優れた抗癌剤であるといえる。

実施例 10

金属ポルフィリン錯体と過酸化水素（ H_2O_2 ）の相互作用：

一般に、大過剰の過酸化水素（ H_2O_2 ）存在下において、低分子の金属ポルフィリン錯体はポルフィリン環が露出しているため、 H_2O_2 と頻度高く相互作用するので分解し易いことが報告されている [R. F. Pasternack and B. Halliwell, J. Am. Chem. Soc., 101, 1026 (1979)]。そこで、低分子系であるM n T 2 M P y P、ニオソーム（高分子）系であるM n T 2 M P y P / 1 S A S包埋T W 6 1 - c h o lニオソーム（本発明品5）、M n T 2 M P y P / 4 S A S包埋T W 6 1 - c h o lニオソーム（本発明品6）と H_2O_2 の相互作用をU V - v i s測定より検討した。すなわち、様々な濃度の H_2O_2 との相互作用およびこれによる分解に基づくポルフィリン錯体S o r e t帯吸収ピーク（456 nm）の減衰曲線測定およびその減衰曲線から反応速度定数（ $k_{H_2O_2}$ ）を算出し、それより算出した半減期（ $t_{1/2}$ ）より評価した。なお、参考として銅／亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（C u / Z n - S O D）の結果も合わせて示す。また、試料の調製は実施例2に基づいておこない、 H_2O_2 濃度は1.2、2.0、3.0、30 mM、金属ポルフィリン錯体濃度は5 μ Mとした。これらの結果を表4に示す。

表 4

| 金属ポルフィリン錯体系 | $t_{1/2}$ (sec) |
|--|-----------------|
| MnT2MPyP | 730 |
| MnT2MPyP/1SAS包埋TW61 -choIニオソーム(本発明品5) | 1005 |
| MnT2MPyP/4SAS包埋TW61 -choIニオソーム(本発明品6) | 806 |
| Cu/Zn-SOD(比較品) | 10 |

この結果から、 $t_{1/2}$ はCu/Zn-SOD<MnT2MPyP<MnT2MPyP/4SAS包埋TW61-choIニオソーム<MnT2MPyP/1SAS包埋TW61-choIニオソームの順に増加した。この理由は、MnT2MPyPは低分子系のためポルフィリン環が露出してH₂O₂と頻度高く相互作用するので分解し易いのに対し、MnTM2PyP包埋TW61-choIニオソームでは高分子系のためポルフィリン環が露出しておらずH₂O₂と頻度高く相互作用しないので分解し難いためと考えられる。この結果は、実施例7の蛍光スペクトル測定の結果と対応している。また、MnT2MPyP/1SAS包埋TW61-choIニオソームの $t_{1/2}$ はCu/Zn-SODのそれに比べて大きく、Cu/Zn-SODに比べて高いH₂O₂耐性を有することも示された。

実施例 11

Por包埋ニオソームのSOD活性評価(その1) :

Por包埋ニオソームのSOD活性(すなわち、O₂⁻・消去活性)をマッコード、フライドビッチらおよびバトラーらのチトクロームc法により評価した[(1) J. M. Mccord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049 (1969) および (2) J. Butler, W. H. Kopenol, E. Margoliash, J. Biol. Chem., 257, 10747 (1982)]。具体的には下記のように行った。金属ポルフィリン濃度で0~1000 μMのPor包埋ニオソーム溶液(A溶液)を5水準以上調製した。次に、0.3 mMキサンチン水溶液、60 μMチトクロームc水溶液および30 mMリン酸

緩衝水溶液（pH 7.8、）を各 20 ml 取り、さらに、純水 24 ml を加えて混合溶液（B 溶液）を得た。この B 溶液 2.1 ml に A 溶液 0.3 ml と純水 0.2 ml を加えて放置（25℃、10 min）した。放置後の混合溶液に 7 μ g/ml カタラーゼ水溶液 0.1 ml、25 U/ml キサンチンオキシダーゼ（XOD）水溶液 5 μ l をすばやく混合して 550 nm（フェロチクローム c 生成に基づく吸収ピーク）における UV-vis の経時測定を行った（最終的な試験溶液の各成分の濃度は、金属ポルフィリン錯体 0～100 μ M、キサンチン 0.05 mM、XOD 2.5 U/ml、チクローム c 10 μ M およびカタラーゼ 0.23 μ g/ml である）。また、Por 包埋ニオソーム無添加系（ブランク）でも同様に測定した。

これら UV-vis の経時測定における「時間－550 nm での吸光度」の関係より Por 包埋ニオソーム無添加系および添加系でのフェロチクローム c 生成速度（ v_i および v_o ）を求め、さらに、下式から阻害率（IC）を算出し、最終的に、「金属ポルフィリン錯体濃度－IC」の関係より IC＝50% おける金属ポルフィリン濃度（ IC_{50} ）を求めてこれを SOD 活性の指標とした（ IC_{50} が小さいほど高い SOD 活性を示す）。なお、参照として MnT4MPyP 等についても同様に SOD 活性を評価した。

$$\text{阻害率 (IC)} = 1 - (v_i / v_o)$$

v_o : Por 包埋ニオソーム無添加系でのフェロチクローム c 生成速度

v_i : Por 包埋ニオソーム添加系でのフェロチクローム c 生成速度

表 5 に各種金属ポルフィリン錯体系の IC_{50} を示す。なお、MnT4MPyP の IC_{50} はフライドビッチらの文献値を示した [I. Batinic-Haberle, L. Benov, and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 273, 24251 (1998)]。

表 5

| 金属ポルフィリン錯体系 | IC ₅₀ (μM) |
|---|-----------------------|
| MnT2MPyP/1SAS包埋TW61 -cho1ニオソーム (本発明品5) | 0.32 |
| MnT2MPyP/4SAS包埋TW61 -cho1ニオソーム (本発明品6) | 0.18 |
| MnT2MPyP | 0.18 |
| MnT4MPyP | 0.43 |
| MnT4MPyP | 0.7*1 |

*1 I. Batinic-Haberle, L. Benov, and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 273, 24251 (1998)

この結果、MnT2MPyP/1SAS包埋TW61-cho1ニオソームおよびMnT2MPyP/4SAS包埋TW61-cho1ニオソームのIC₅₀は低分子系 [MnT2MPyP (文献値)] のそれらと類似となり、効果的なSOD活性を示すことが明らかになった。

実施例 12

Por包埋ニオソームのSOD活性評価 (その2) :

Por包埋ニオソームのSOD活性 (すなわち、O₂⁻・消去活性) をリレイ (Riley) らのストップフロー法により評価した [D. P. Riley, W. L. Rivers, and R. H. Weiss, Anal. Biochem., 196, 344 (1991)]。具体的には下記のように行った。36℃において、O₂⁻・発生源である超酸化カリウムを含むジメチルスルホキシド溶液と各種濃度のPor包埋ニオソームを含む60mM HEPES/HEPESNa緩衝溶液 (pH 8.1) を急速混合し、O₂⁻・に基づく245nmの吸光度の減衰 (O₂⁻・消失反応の減衰曲線) を経時的に測定した。この減衰曲線より「ln (吸光度) - 時間」の関係を求め、さらに、この関係の傾きより見かけの速度定数を算出した。最終的に、「金属ポルフィリン錯体濃度 - 見かけの速度定数」関係の傾きよりO₂⁻・消失反応の速度定数 (k_{cat}) を求めた。

表 6 に各種金属ポルフィリン錯体系の k_{cat} を示す。なお、MnT4MPyP の k_{cat} はオオセ、カワカミらの文献値で示した [T. Ohse, S. Nagaoka, Y. Arakawa, H. Kawakami, and K. Nakamura, J. Inorg. Biochem., 85, 201 (2001)] 。

表 6

| 金属ポルフィリン錯体系 | k_{cat} ($M^{-1} s^{-1}$) |
|---|-------------------------------|
| MnT2MPyP / 1 SAS 包埋 TW61-cholesterol ニオソーム (本発明品 5) | 3.1×10^7 |
| MnT2MPyP / 4 SAS 包埋 TW61-cholesterol ニオソーム (本発明品 6) | 2.0×10^7 |
| MnT2MPyP | 2.1×10^7 |
| MnT4MPyP | 1.4×10^7 |
| MnT4MPyP | 2.2×10^7 *2 |

*2 T. Ohse, S. Nagaoka, Y. Arakawa, H. Kawakami, and K. Nakamura, J. Inorg. Biochem., 85, 201 (2001).

この結果、MnT2MPyP / 1 SAS 包埋 TW61-cholesterol ニオソームおよび MnT2MPyP / 4 SAS 包埋 TW61-cholesterol ニオソームの k_{cat} は低分子系 [MnT2MPyP (文献値)] のそれらと近く、効果的な SOD 活性を示していた。

産業上の利用可能性

本発明の Por 包埋ニオソームは、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot -}$) をターゲットとし、これを確実に低減させることができるものである。

従って、癌細胞中の $O_2^{\cdot -}$ を低下させて癌の治療に優れた効果を奏することができ、しかもその効果は選択的であるので、副作用のない新たな抗癌剤として利用可能なものである。

また、本発明のP o r包埋ニオソームは、S O D活性を有し、血液中滞留も可能であるという抗酸化剤として優れた効果を有するので、活性酸素のもたらす生体内障害から生体を守ることができるものである。

請 求 の 範 囲

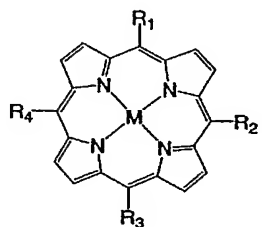
1. カチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質とを含有する金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

2. カチオン化金属ポルフィリン錯体がアニオン性界面活性剤とイオンコンプレックスを形成している状態で存在する請求項1記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

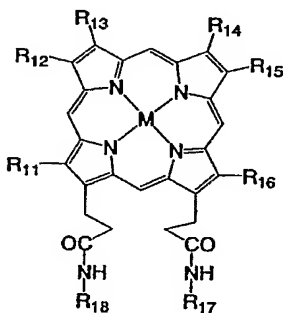
3. ニオソーム形成物質が、ノニオン性界面活性剤またはこれとコレステロール類もしくはトリアシルグリセロールの混合物である請求項第1項または第2項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

4. 粒径100nm以下の小胞体である請求項第1項ないし第3項の何れかの項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

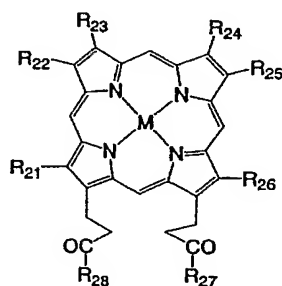
5. 前記カチオン化金属ポルフィリン錯体が、次式(I)、(II)または(III)



(I)



(II)



(III)

(式中、 R_1 ないし R_4 の少なくとも一つは、N-低級アルキルピリジル基、低級アルキルアンモニオフェニル基、N-低級アルキルイミダゾリル基から選ばれ

る基を、 R_{11} ないし R_{16} および R_{21} ないし R_{26} は、低級アルキル基または低級アルコキシ基を、 R_{17} および R_{18} N-低級アルキルピリジル基、低級アルキルアンモニオフェニル基、N-低級アルキルイミダゾリル基から選ばれる基を、 R_{27} ないし R_{28} はN-アルキルアンモニオ基を示す)

で表されるものである請求項第1項ないし第4項の何れかの項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

6. 前記カチオン化金属ポルフィリン錯体が、金属[5,10,15,20-テトラキス(2-メチルピリジル)ポルフィリン](MT2MPyP)、金属[5,10,15,20-テトラキス(4-メチルピリジル)ポルフィリン](MT4MPyP)または金属[[1,3,5,8-テトラメチル-2,4-ジビニル-6,7-ジ(4-メチルピリジルアミドエチル)]ポルフィリン](MPPIX-DMPyAm)の1種または2種以上であり、当該錯体の金属部分(M)が、鉄(Fe)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、銅(Cu)、モリブデン(Mo)、クロム(Cr)またはイリジウム(Ir)であることを特徴とする請求項第1項ないし第5項の何れかの項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

7. ノニオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステルまたはポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマーの1種または2種以上である請求項第3項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

8. ノニオン性界面活性剤が、Tween-61、Tween-80、Span 80若しくはプルロニックF-88の1種または2種以上である請求項第3項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

9. コレステロール類が、コレステロール、 α -コレスタノール、 β -コレスタノール、コレスタン、デスモステロール（5,24-コレスタジエン-3 β -オール）、コール酸ナトリウムまたはコレカルシフェロールである請求項第3項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

10. カチオン化金属ポルフィリン錯体とイオンコンプレックスを形成しているアニオン系界面活性剤が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ドデシル硫酸、テトラデシル硫酸、ヘキサデシル硫酸若しくはオクタデシル硫酸またはそれらの塩である請求項第2項記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソーム。

11. カチオン化金属ポルフィリン錯体とニオソーム形成物質を混合し、次いでこの混合物を媒質中で超音波処理することを特徴とする金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームの製造法。

12. カチオン化金属ポルフィリン錯体とアニオン系界面活性剤を反応させてイオンコンプレックスを形成させ、次いで、このイオンコンプレックスとニオソーム形成物質を混合し、更にこの混合物を媒質中で超音波処理することを特徴とする金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームの製造法。

13. 請求項第1項ないし第9項の何れかの項に記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームを有効成分として含有する医薬。

14. 抗癌剤である請求項第13項記載の医薬。

15. 抗酸化剤である請求項第14項記載の医薬。

16. 炎症疾患、神経疾患、動脈硬化または糖尿病の治療用薬剤である請求項第13項記載の医薬。

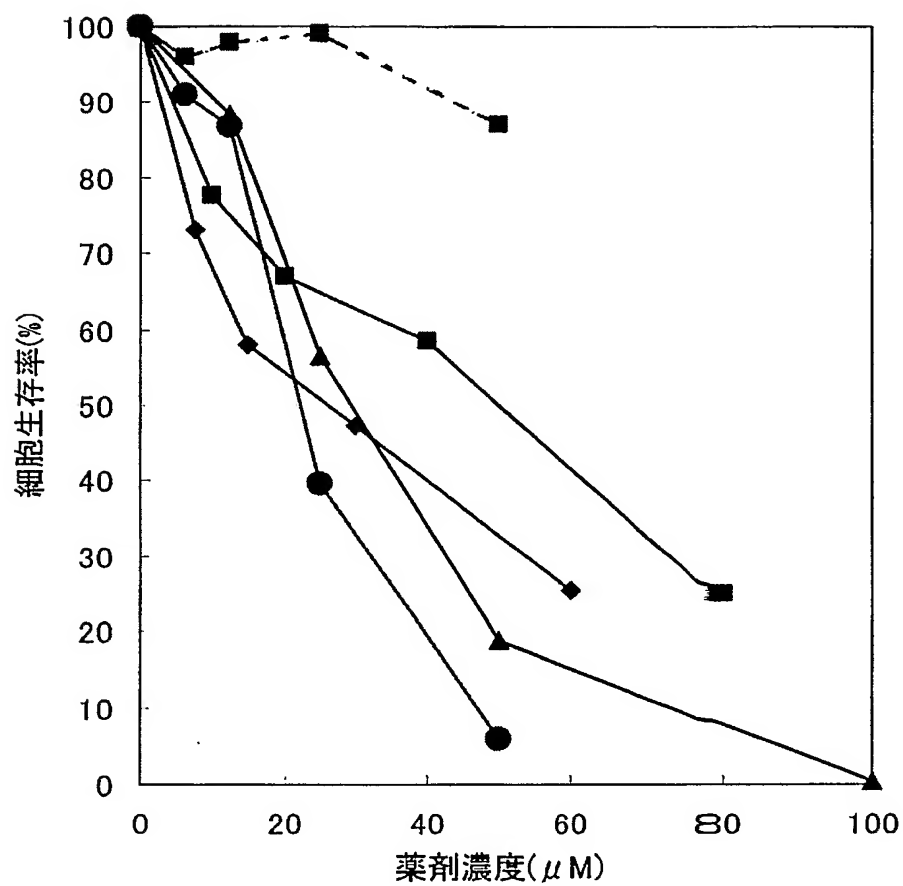
17. 請求項第1項ないし第9項の何れかの項に記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームを癌患者に投与することを特徴とする癌の治療方法。

18. 直接投与、静脈内投与または皮下投与である請求項第17項記載の治療方法。

19. 請求項第1項ないし第9項の何れかの項に記載の金属ポルフィリン錯体包埋ニオソームを、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化または糖尿患者に投与することを特徴とするこれら疾患の治療方法。

1 / 1

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/409, 45/06, A61P3/10, 9/10, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/409, 45/06, A61P3/10, 9/10, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1926-1992 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-1996 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-1992 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2004 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | JP 2000-247978 A (Toyo Ink Manufacturing Co., Ltd.), 12 September, 2000 (12.09.00), Full text (Family: none) | 1-16 |
| Y | JP 5-229948 A (Toyo Jozo Co., Ltd.), 07 September, 1993 (07.09.93), Full text (Family: none) | 1-16 |
| Y | EP 350948 A2 (Toyo Hakko Kogyo Co., Ltd.), 17 January, 1990 (17.01.90), Full text & JP 2-138280 A | 1-16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2004 (27.04.04)

Date of mailing of the international search report
18 May, 2004 (18.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002750

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | WO 91/04667 A1 (Rockefeller University), 18 April, 1991 (18.04.91), Full text & JP 4-502019 A | 1-16 |
| Y | WO 98/32463 A2 (Pharmacia & Upjohn Co.), 30 July, 1998 (30.07.98), Full text & JP 2001-511128 A | 1-16 |
| Y | WO 99/02539 A1 (Geange Ltd., Ire.), 21 January, 1999 (21.01.99), Page 14, line 12 & JP 2001-509510 A | 1-16 |
| Y | WO 95/23597 A1 (Trans-Onycha Ltd.), 08 September, 1995 (08.09.95), Claims & JP 9-509676 A | 1-16 |
| Y | US 5882674 A (LTS Lohmann Therapie-Systeme GmbH.), 16 March, 1999 (16.03.99), Claim 8 & JP 10-501539 A | 1-16 |
| Y | US 4830857 A (Oreal S.A.), 16 May, 1989 (16.05.89), Full text & JP 61-178909 A | 1-16 |
| Y | GB 2189457 A1 (Oreal S.A.), 28 October, 1987 (28.10.87), Full text & JP 63-23737 A | 1-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002750

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17 to 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17 to 19 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/409, 45/06, A61P3/10, 9/10, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/409, 45/06, A61P3/10, 9/10, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992
 日本国公開実用新案公報 1971-1992
 日本国登録実用新案公報 1994-1996
 日本国実用新案登録公報 1996-2004

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | JP 2000-247978 A (東洋インキ製造株式会社) 2000.09.12 全文 (ファミリーなし) | 1-16 |
| Y | JP 5-229948 A (東洋醸造株式会社) 1993.09.07 全文 (ファミリーなし) | 1-16 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.04.2004

国際調査報告の発送日

18.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 岩下 直人

4C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | EP 350948 A2 (Toyo Hakka Kogyo Co., Ltd.) 1990. 01. 17 全文 & JP 2-138280 A | 1-16 |
| Y | WO 91/04667 A1 (Rockefeller University) 1991. 04. 18 全文 & JP 4-502019 A | 1-16 |
| Y | WO 98/32463 A2 (Pharmacia & Upjohn Company) 1998. 07. 30 全文 & JP 2001-511128 A | 1-16 |
| Y | WO 99/02539 A1 (Geange Limited, Ire.) 1999. 01. 21 page 14 line 12 & JP 2001-509510 A | 1-16 |
| Y | WO 95/23597 A1 (Trans-Onycha Ltd.) 1995. 09. 08 Claims & JP 9-509676 A | 1-16 |
| Y | US 5882674 A (LTS Lohmann Therapie-Systeme Gmb H) 1999. 03. 16 Claim 8 & JP 10-501539 A | 1-16 |
| Y | US 4830857 A (Oreal S.A.) 1989. 05. 16 全文 & JP 61-178909 A | 1-16 |
| Y | GB 2189457 A1 (Oreal S.A.) 1987. 10. 28 全文 & JP 63-23737 A | 1-16 |

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 17-19 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものである。PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。